

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 9/127, 47/28, 39/39	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/14831 (43) Date de publication internationale: 23 mai 1996 (23.05.96)
--	-----------	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01495

(22) Date de dépôt international: 14 novembre 1995 (14.11.95)

(30) Données relatives à la priorité:
94/13606 14 novembre 1994 (14.11.94) FR(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR
MERIEUX SERUMS & VACCINS [FR/FR]; 58, avenue
Leclerc, F-69007 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): HAENSLER, Jean
[FR/FR]; 17, rue J. Piccandet, F-69290 St Genis-les-
Ollières (FR). TRANNOY, Emmanuelle [FR/FR]; 4, rue
Pauline-Marie-Jaricot, F-69005 Lyon (FR). RONCO, Jorge
[FR/FR]; 30, rue G. Martin Witkowski, F-69005 Lyon
(FR).(74) Mandataires: BERNASCONI, Jean etc.; Cabinet Lavoix, 2,
place d'Estienne-d'Orves, F-75441 Paris Cédex 09 (FR).(81) Etats désignés: AL, AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ,
EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS,
LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU,
SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen
(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, LS,
MW, SD, SZ, UG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: ADJUVANT FOR A VACCINE COMPOSITION

(54) Titre: ADJUVANT POUR COMPOSITION VACCINALE

(57) Abstract

An amphipathic compound including a sterol-derived lipophilic grouping bound to a cationic grouping for use as an adjuvant in the delivery of a vaccine composition. In a particular embodiment, the lipophilic grouping is a cholesterol derivative and the cationic grouping is a quaternary ammonium or a protonatable amine. A vaccine composition including one or more antigens with at least one amphipathic compound having a sterol-derived lipophilic grouping bound to a cationic grouping, is also disclosed.

(57) Abrégé

L'invention a pour objet un composé amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique pour son utilisation comme adjuvant dans l'administration d'une composition vaccinale. Selon un mode particulier, le groupement lipophile est un dérivé de cholestérol et le groupement cationique est un ammonium quaternaire ou une amine protonable. L'invention concerne aussi une composition vaccinale comprenant un ou plusieurs antigènes avec au moins un composé amphipathique possédant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

5

Adjuvant pour composition vaccinale

La présente invention est relative au domaine des compositions vaccinales. Plus particulièrement, l'invention concerne de nouveaux adjuvants utilisés pour augmenter l'immunogénicité de compositions vaccinales.

10 Il existe une grande quantité d'antigènes qui, injectés chez l'animal, vont provoquer une fabrication d'anticorps qui leur sont spécifiques. Un des principes de la vaccination est de stimuler la fabrication d'anticorps par l'organisme d'un homme ou d'un animal, en lui administrant des antigènes choisis. Les anticorps ainsi fabriqués
15 permettront, ensuite, à l'organisme de se défendre contre une infection ultérieure. Cependant, certains antigènes n'entraînent pas de stimulation suffisante du système immunitaire lorsqu'ils sont administrés seuls. Il est donc nécessaire de leur adjoindre un adjuvant qui va permettre d'augmenter la réponse immunitaire de l'organisme afin d'obtenir une quantité d'anticorps suffisante pour être protectrice.

20 Parmi les adjuvants connus, on peut citer l'hydroxyde d'aluminium et le phosphate d'aluminium qui sont utilisés habituellement dans les vaccins humains. Cependant, ces composés ne possèdent pas de propriété adjuvante vis-à-vis de tous les antigènes. Ils ne permettent notamment pas d'augmenter l'immunogénicité du vaccin contre la grippe.

Il est donc nécessaire de pouvoir disposer d'adjuvants qui permettent d'augmenter
25 l'immunogénicité des antigènes administrés dans une composition vaccinale, sans aucun risque de toxicité.

En outre, il est intéressant de disposer d'adjuvants capables d'induire une réponse immunitaire se traduisant par une production d'anticorps sécrétoires, tels que des IgA.

Pour atteindre ce but, l'invention propose l'utilisation d'un composé
30 amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique pour la fabrication d'une composition vaccinale.

L'invention a aussi pour objet l'utilisation d'un tel composé
amphipathique comme adjuvant dans l'administration d'un vaccin.

L'invention a également pour objet une composition vaccinale comprenant au
35 moins un antigène, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un composé amphipathique possédant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique.

L'invention a encore pour objet un produit contenant au moins un antigène et un
40 composé amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un

- 5 groupement cationique , comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps en vaccination.

10 Un autre objet de l'invention est une méthode d'induction d'une réponse immunitaire chez un mammifère, consistant à administrer au mammifère au moins un antigène, caractérisée en ce qu'elle consiste à administrer en outre au moins un composé amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique.

15 Au sens de la présente invention, le terme amphipathique désigne un composé qui possède à la fois une portion hydrophobe et une portion hydrophile.

20 Parmi les dérivés de stérol pouvant conduire aux composés selon l'invention, on peut citer le cholestérol, le phytostérol, l'ergostérol. Les dérivés de cholestérol conviennent particulièrement bien.

Le groupement cationique des composés amphipathiques selon l'invention peut être constitué par un ammonium quaternaire ou une amine protonable.

25 Le groupement lipophile est relié au groupement cationique grâce à une liaison ester, éther, amide ou carbamoyle parmi lesquelles les liaisons ester, amide et carbamoyle présentent l'avantage d'être hydrolysables dans la cellule.

30 La liaison entre les 2 groupements est réalisée de préférence par l'intermédiaire d'un bras espaceur constitué par une chaîne alkylque ramifiée ou non comprenant de 1 à 20 atomes de Carbone.

Parmi les composés convenant aux fins de l'invention, on peut citer ceux mentionnés dans le brevet US 5 283 185 et notamment :

- 35 - l'iodure de cholestéryl-3 β -carboxamidoéthylènetriméthylammonium,
- la cholestéryl-3 β -carboxyamidoéthylèneamine,
- l'iodure de cholestéryl-3 β -oxysuccinamidoéthylènetriméthylammonium,
- le 3 β -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-cholestérol,
- le 3 β -[N-(polyéthylènimine)-carbamoyl]-cholestérol.

40 parmi lesquels le 3 β -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-cholestérol est particulièrement avantageux.

5 Les composés amphipathiques selon l'invention peuvent être obtenus par condensation entre un dérivé de stérol et un composé à groupement cationique, selon une des méthodes décrites dans "Advanced Organic Chemistry" Part B : Reactions and Synthesis (F.A. Carey and R.J. Sundberg - Plenum Publishing Corp.). Plus
10 particulièrement, on peut réaliser certains des composés selon l'invention selon les méthodes décrites dans le brevet US 5 283 185.

Les composés amphipathiques obtenus en solution alcoolique peuvent, ensuite, être dispersés dans de l'eau ou dans un tampon aqueux et conduire à une suspension de micelles ou de liposomes. Avantageusement, les composés amphipathiques de
15 l'invention sont associés à un lipide neutre tel qu'un phospholipide, par exemple la dioleoyl phosphatidyléthanolamine (DOPE) ou la dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC). Cette association conduit les composés amphipathiques selon l'invention à s'organiser sous forme de liposomes plutôt que de micelles lors de la phase de dispersion dans un environnement aqueux. La proportion molaire de lipide neutre associé aux composés
20 amphipathiques est, de préférence, supérieure à 20 %.

Les produits obtenus selon l'invention n'ont conduit à aucune réaction de toxicité aigüe lors de leur inoculation à des souris.

25 L'antigène utilisé pour induire une réponse immunitaire protectrice est constitué par n'importe quel antigène utilisé habituellement dans une composition vaccinale, que ce soit seul ou en combinaison avec un autre antigène.

De façon particulière, les composés amphipathiques selon l'invention se révèlent
30 de bons immuno-adjuvants lorsqu'ils sont associés au vaccin contre le virus de la grippe qui comprend notamment : la protéine HA qui est une hémagglutinine située à la surface de l'enveloppe du virus Influenza, la protéine NP qui est une nucléoprotéine de capsidie liée à l'ARN viral et une protéine M ou "matrice" protéique de l'enveloppe.

35 L'association entre l'antigène dont on veut accroître l'immunogénicité et la suspension micellaire ou liposomale de composés amphipathiques est réalisée spontanément par interaction hydrophobe et électrostatique lors du mélange des constituants.

40 Les compositions vaccinales obtenues présentent une bonne stabilité. Cependant, la suspension liposomale semble préférable à la suspension micellaire.

5 En outre, la suspension liposomale est stérilisable par filtration et lyophilisable.

Il est évident qu'il est possible d'ajouter aux compositions vaccinales obtenues des éléments utilisés classiquement dans les vaccins, tels que de l'eau, du sérum physiologique ou une substance tampon.

10

L'administration des compositions vaccinales obtenues selon l'invention peut être effectuée par toutes les voies habituellement utilisées pour l'administration de vaccins et, notamment, par voie sous-cutanée ou intranasale. Il est possible aussi de choisir pour la première immunisation et l'immunisation de rappel une voie différente.

15

Il est possible d'administrer, de façon séparée, la composition comprenant l'antigène et la composition contenant les composés amphipathiques selon l'invention ; cependant, l'administration d'une composition liposomale de composés amphipathiques selon l'invention associés à l'antigène permet non seulement d'augmenter la réponse immunitaire de type humorale, mais aussi d'induire des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques.

20

L'invention sera mieux comprise à la lecture des exemples non limitatifs qui suivent, en référence aux figures.

25

La figure 1 illustre le schéma de réaction de la fabrication du DC chol. Les figures 2 à 6 représentent les résultats des tests d'induction des lymphocytes T cytotoxiques pour chaque groupe de souris mentionné à l'exemple 8.

30

La figure 7 représente les résultats mentionnés à l'exemple 11.

Les figures 8 et 9 représentent les résultats mentionnés à l'exemple 12.

Les figures 10 et 11 représentent les résultats mentionnés à l'exemple 13.

35

Les figures 12 et 13 représentent les résultats mentionnés à l'exemple 14.

Les figures 14 et 15 représentent les résultats mentionnés à l'exemple 15.

40

La figure 16 représente les résultats mentionnés à l'exemple 16.

5 **Exemple 1 : synthèse de 3 β -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-cholestérol (DC chol)**

Le DC chol est synthétisé par réaction de cholestéryl chloroformate et de N,N-diméthyléthylènediamine selon le schéma de la figure 1, ainsi que cela est décrit dans
10 l'article de X. Gao et L. Huang (BBRC 179 (1) : 280-285).

Une solution de cholestéryl chloroformate (2,25 g, 5 mmol dans 5 ml de chloroforme sec) est ajoutée goutte à goutte à une solution en excès de N,N-diméthyléthylènediamine (2 ml, 18.2 mmol dans 3 ml de chloroforme sec) à 0°C. Après
15 extraction du solvant par évaporation, le résidu est purifié par 2 recristallisations successives dans de l'éthanol absolu à 4°C et séché sous vide. On obtient alors 0,545 g de DC chol sous forme de poudre blanche. La structure du composé a été vérifiée par RMN et spectrométrie de masse. Les résultats obtenus sont conformes aux données publiées dans l'article cité ci-dessus.

20

Exemple 2 : Préparation d'une composition vaccinale contre le virus de la grippe, à partir d'une suspension micellaire de DC chol 2,3 mg

30 mg de DC chol obtenu selon l'exemple 1 sont dissous dans 100 μ l d'éthanol.
25 75 μ l de la solution ainsi obtenue sont injectés par l'intermédiaire d'une seringue Hamilton dans 3 ml d'eau maintenue sous agitation à 45°C. Après 5 minutes d'agitation supplémentaire à 45°C, la suspension micellaire obtenue est mélangée à 200 μ l du vaccin monovalent contre le virus de la grippe (souche A Singapour) comprenant notamment comme antigènes : l'hémagglutinine HA, la nucléoprotéine NP et la protéine
30 M.

Le mélange obtenu est fractionné en doses vaccinales de 0.3 ml. Chaque dose comprend 5 μ g de HA et 2,3 mg de DC chol.

35 **Exemple 3 : Préparation d'une composition vaccinale contre le virus de la grippe, à partir d'une suspension micellaire de DC chol 0,45 mg**

On procède comme dans l'exemple 2 en partant de 6 mg de DC chol obtenu selon l'exemple 1.

40

Exemple 4 : Préparation d'une suspension de liposomes constitués par du DC chol associé à de la dioleoyl phosphatidyléthanolamine (DOPE)

- 5 On mélange 18 mg de dioleoyl phosphatidyléthanoline (DOPE) et 4,5 mg de DC chol obtenu selon l'exemple 1, que l'on met en solution dans 3 ml de chloroforme.

Le chloroforme est évaporé sous vide pour constituer un film lipidique qui est soumis à dessiccation sous vide, puis remis en suspension dans 3 ml d'eau.

10

Après hydratation pendant 24 heures à 4°C, la dispersion est soumise à sonication pendant 5 à 10 minutes dans un bain à ultra-sons (Laboratory Supplies - Hicksville - N.Y.) pour former des liposomes.

15

Cette suspension est stable pendant au moins 6 mois à 4°C.

Exemple 5 : Préparation d'une suspension de liposomes constitués par du DC chol associé à de la dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC)

20

On procède comme dans l'exemple 4 en remplaçant les 18 mg de DOPE par 18 mg de dioleoylphosphatidylcholine (DOPC).

On obtient une suspension liposomale stable pendant au moins 6 mois à 4°C.

25

Exemple 6 : Préparation d'une composition vaccinale contre le virus de la grippe à partir d'une suspension liposomale DC chol/DOPE

3 ml d'une suspension liposomale obtenue selon l'exemple 4 sont mélangés à 0,2 ml du vaccin grippe monovalent de la souche A/ Singapour contenant l'équivalent de 50 µg de l'antigène constitué par l'hémagglutinine HA.

30

Le mélange obtenu est ensuite fractionné en 10 doses vaccinales de 0,3 ml, comportant chacune 5 µg de HA et 0,45 mg de DC chol.

35

Exemple 7 : Préparation d'une composition vaccinale contre le virus de la grippe à partir d'une suspension liposomale DC chol/DOPC

3 ml d'une suspension liposomale obtenue selon l'exemple 5 sont mélangés à 0,2 ml du vaccin grippe monovalent de la souche A/ Singapour.

40

Le mélange obtenu est ensuite fractionné en 10 doses vaccinales de 0,3 ml comportant chacune 5 µg de HA et 0,45 mg de DC chol.

5 Exemple 8 : Immunisation

On immunise 5 groupes de 4 souris Balb/c par 3 injections sous-cutanées effectuées à J0, J21 et J36 avec les compositions vaccinales suivantes :

10 Groupe A : 0,3 ml de vaccin grippe monovalent souche A/ Singapour dilué à 5 µg de HA dans 0,3 ml de PBS,

Groupe B : 0,3 ml de composition vaccinale obtenue selon l'exemple 2,

15 Groupe C : 0,3 ml de composition vaccinale obtenue selon l'exemple 3,

Groupe D : 0,3 ml de composition vaccinale obtenue selon l'exemple 6,

Groupe E : 0,3 ml de composition vaccinale obtenue selon l'exemple 7.

20

Exemple 9 : Dosage en anticorps anti-HA

Afin d'effectuer les dosages en anticorps neutralisants, on prélève les sérums de souris à J21, J36 et J51 et on effectue le titrage en anticorps anti-HA grâce à la technique d'inhibition de l'hémagglutination induite par le virus de la grippe.

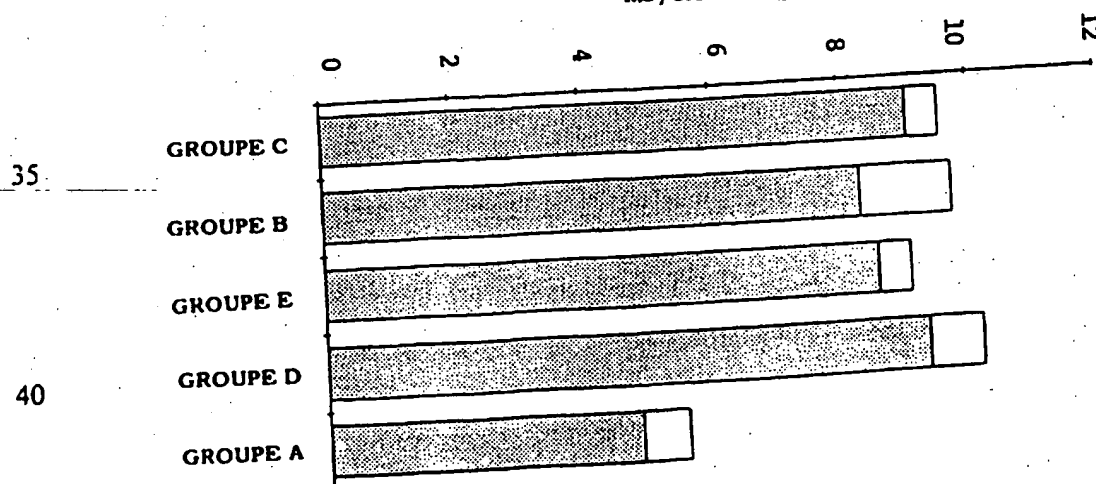
25

Le tableau 1 ci-dessous illustre les résultats obtenus pour chaque groupe de souris après une injection et le tableau 2 les résultats après 2 injections.

30

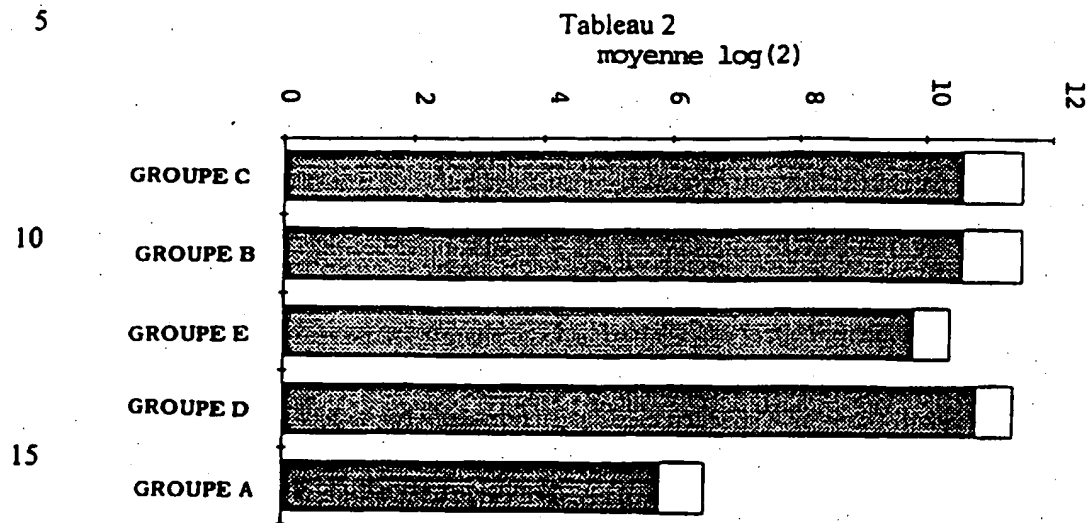
Tableau 1

moyenne log(2)



35

40



Les titres d'anticorps neutralisants dans les sérums des souris sont présentés en log2 de la dilution la plus forte induisant l'inhibition de l'hémagglutination.

Ces résultats montrent clairement le rôle d'adjuvant joué par le DC chol. En effet, le taux d'anticorps anti-HA est nettement plus élevé pour les lots de souris ayant reçu du DC chol comparativement aux souris ayant reçu le vaccin sans adjuvant (Groupe A).

Il est important de noter que les taux d'anticorps neutralisants dans les groupes B, C, D et E sont supérieurs au taux d'anticorps neutralisants dans le groupe A même après une injection unique des différentes compositions vaccinales. Ces titres augmentent encore légèrement et se stabilisent après la deuxième injection. Les résultats obtenus après la 3ème injection sont sensiblement égaux à ceux de la 2ème injection (non représentés).

Des essais réalisés avec un vaccin grippe trivalent comprenant la souche A Texas, la souche B Panama et la souche A Beijing ont également démontré le pouvoir adjuvant du DC chol.

Exemple 10 : Mise en évidence de l'induction de cellules T cytotoxiques

On prélève à J51 les cellules spléniques des souris de chacun des groupes mentionnés à l'exemple 8.

Ces cellules effectrices sont restimulées in vitro en présence de cellules stimulantes syngéniques infectées par le virus de la souche A/ Singapour correspondant

5 au vaccin testé. La fonction cytotoxique spécifique de ces cellules stimulées est mise en évidence en utilisant comme cellules cibles la lignée de mastocytomes P815 sensibilisés par incubation avec un peptide épitope CTL de l'hémagglutinine du virus (réponse spécifique contre la HA) ou avec un peptide épitope CTL de la nucléoprotéine du virus (réponse spécifique contre la NP). La lyse non spécifique (bruit de fond) est mesurée sur
10 des cellules P815 non sensibilisées ou sensibilisées avec un peptide épitope CTL du virus HIV (V3MN).

La lyse des cellules cibles est mesurée par une technique radioactive basée sur le chargement des cellules cibles en Cr-51 et sur le relargage de ce radioélément lors de la
15 lyse cellulaire.

Les résultats présentés sur les figures 2 à 6 qui illustrent le pourcentage de cytotoxicité en fonction du rapport cellules effectrices sur cellules cibles pour chacun des groupes de souris testés, montrent qu'il est particulièrement avantageux d'utiliser
20 une composition liposomale de DC chol en particulier en association avec un lipide neutre, car celle-ci permet d'induire des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques en plus de la réponse immunitaire de type humoral obtenue grâce à l'action adjuvante du DC chol.

25 **Exemple 11 : Etude de la réponse immunitaire en fonction de la dose de DCchol utilisée**

On réalise des compositions vaccinales de 300 µl comportant chacune du vaccin grippe monovalent de la souche A/Singapour et contenant soit 15 soit 5 µg de HA, associé à des liposomes de DC chol/DOPC à une concentration variable. La préparation
30 de la suspension liposomale est réalisée de façon similaire à celle de l'exemple 4, en remplaçant les 18 mg de dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE) par 13.5 mg de dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC) et en reprenant le film lipidique obtenu par une quantité d'eau variable selon la concentration en DC chol souhaitée.

35

On injecte les compositions vaccinales obtenues à des groupes de 5 souris Balb/c femelles de 8 à 10 semaines à J 0 et à J 28. On prélève les sérums à J 42 et on dose les Anticorps anti-HA par la technique d'inhibition de l'agglutination (IHA).

40

On teste ainsi les compositions suivantes :

- 15 µg de HA + 0 µg de DC chol

15 µg de HA + 400 µg de DC chol

- 5 - 5 µg de HA + 0 µg de DC chol
 5 µg de HA + 25 µg de DC chol
 5 µg de HA + 50 µg de DC chol
 5 µg de HA + 100 µg de DC chol
 5 µg de HA + 200 µg de DC chol
10 5 µg de HA + 300 µg de DC chol
 5 µg de HA + 400 µg de DC chol

Les résultats exprimés en log base 2 de la dilution la plus forte induisant l'inhibition de l'hémagglutination sont représentés sur la figure 7 et montrent que ce
15 n'est qu'au-dessus de 100 µg de DC chol/dose que l'on bénéficie du maximum de l'effet adjuvant du DC chol.

Exemple 12 : Mise en évidence de l'induction de différents isotypes d'anticorps

20

On réalise une étude comparative des anticorps induits chez 3 groupes de 5 souris adultes BALB/c, femelles de 8 à 10 semaines, ayant reçu 2 injections sous-cutanées effectuées à J 0 et J 28 avec les compositions vaccinales suivantes :

- 25 1er groupe : 0,3 ml de vaccin grippe monovalent souche A/Singapour dilué à
 5 µg de HA dans 0,3 ml de PBS,
 2ème groupe : 0,3 ml de vaccin grippe monovalent souche A/Singapour dilué à
 5 µg de HA adjuvé avec 0,1 mg d'hydroxyde d'aluminium,
 3ème groupe : 0,3 ml de composition vaccinale obtenue selon l'exemple 11 et
30 contenant 5 µg de HA et 400 µg de DC chol associé à du DOPC.

On prélève les sérums des souris à J 28 et à J 42 et on dose par la technique ELISA les IgG1 et IgG2 produites.

- 35 Les résultats obtenus lors de la réponse primaire sont représentés sur la figure 8 et ceux obtenus lors de la réponse secondaire sont représentés sur la figure 9.

Ces résultats illustrent l'effet adjuvant du DC chol tant lors de la réponse primaire que lors de la réponse secondaire, comparativement à l'hydroxyde d'aluminium qui est
40 un adjuvant de l'art antérieur. On remarque, en outre, la forte augmentation des IgG2a produites, ce qui signifie que le DC chol agit en favorisant le développement des lymphocytes de type TH1.

5 **Exemple 13 : Mise en évidence de l'action du DC chol chez des souris âgées**

On réalise exactement la même expérience qu'à l'exemple 12, mais cette fois, les souris testées sont des souris de 20 - 22 mois qu'il est plus difficile de stimuler.

10 Les résultats obtenus lors de la réponse primaire sont représentés sur la figure 10 et ceux de la réponse secondaire sur la figure 11.

Ici encore, le DC chol a un effet d'adjuvant tant pour la réponse primaire que pour la réponse secondaire et notamment vis-à-vis de l'induction d'anticorps IgG2a.

15

Exemple 14 : Taux IHA des souris adultes et des souris âgées

Lors des tests réalisés aux exemples 12 et 13, on détermine chez les souris immunisées les anticorps neutralisants par le test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA).

20

Les résultats obtenus lors de la réponse primaire sont illustrés sur la figure 12 et ceux de la réponse secondaire sur la figure 13. Les titres obtenus, exprimés en log base 2 de la dilution la plus forte inhibant l'hémagglutination, montrent bien le rôle adjuvant des liposomes DC chol/DOPC chez les souris adultes comme chez les souris âgées.

25

Exemple 15 : Immunisation par voie intranasale

On prépare, comme cela a été décrit à l'exemple 11, des compositions vaccinales de 50 µl cette fois, comprenant 5 µg de HA (sous forme de vaccin grippe monovalent, souche A/Singapour) combinés avec 200 µg de DC chol présents sous forme de liposomes DC chol/DOPC (dans une proportion massique de 1 pour 4).

30

On immunise par voie intranasale 2 groupes de 4 souris BALB/c deux fois à 4 semaines d'intervalle.

35

Le 1er groupe de souris (G₁) reçoit 50 µl de la composition vaccinale contenant 200 µg de DC chol alors que le second groupe (G₂) reçoit 50 µl du même vaccin grippe monovalent mais sans adjuvant. On analyse les réponses immunes de chaque groupe par dosage ELISA des sérums prélevés 3 semaines après l'immunisation de rappel.

40

5 Les résultats, exprimés en log base 10 du titre ELISA, sont représentés sur la figure 14 pour ce qui concerne les IgG sériques et sur la figure 15 pour ce qui concerne les IgA sériques.

10 On remarque ainsi que, dans un protocole d'administration muqueux strict, les liposomes DC chol/DOPC permettent d'augmenter les réponses immunes locales et générales d'au moins un facteur 2.

15 Le rôle adjuvant joué par les liposomes DC chol/DOPC dans les réponses immunes générales a également été observé lorsqu'au lieu de mesurer les titres IgG et IgA par ELISA, on a mesuré les titres en anticorps anti-HA par IHA ; l'augmentation de la réponse immune locale a également été observée lors d'un comptage par ELISPOT du nombre de cellules sécrétrices d'IgG et du nombre de cellules sécrétrices d'IgA dans les poumons des souris immunisées, ainsi que lors de la détermination du rapport entre le taux d'IgG (respectivement d'IgA) spécifiques et le taux d'IgG (respectivement d'IgA) 20 totales mesurées par ELISA dans les lavages nasopharyngés des souris immunisées.

Exemple 16 : Immunisation par administration combinée en sous-cutané et par voie intranasale

25 On immunise 2 groupes de 4 souris BALB/c deux fois à 4 semaines d'intervalle avec, à chaque fois, les compositions vaccinales suivantes :

- Groupe 3 (G₃) : - une composition vaccinale de 300 µl injectée en sous-cutané comprenant 4 µg de HA (sous forme de vaccin grippe monovalent souche A/Singapour) combinés avec 6 µg de DC chol (sous forme de liposomes DC chol/DOPC) et,

30 - une composition vaccinale de 50 µl administrée par voie intranasale comprenant 0,25 µg de HA (sous forme de vaccin grippe monovalent souche A/Singapour) combinés avec 6 µg de DC chol (sous forme de liposomes DC chol/DOPC),

35 - Groupe 4 (G₄) : - une composition vaccinale de 300 µl injectée en sous-cutané comprenant 4 µg de HA combinés avec 200 µg de DC chol et,

- une composition vaccinale de 50 µl administrée par voie intranasale comprenant 0,25 µg de HA combinés avec 200 µg de DC chol.

40

- 5 On prélève les sérums des souris immunisées 3 semaines après l'administration de rappel et on dose, pour chacune, le taux d'anticorps neutralisants par la technique IHA d'inhibition de l'hémagglutination.

- 10 Les résultats obtenus, exprimés en log base 2 du titre, sont représentés sur la figure 16 et montrent que, dans un protocole d'administration mixte combinant les voies sous-cutanée et intranasale, le DC chol a un effet adjuvant et que l'augmentation de la dose de DC chol de 6 à 200 µg permet d'accroître la réponse immune.

- 15 Un effet dose identique a pu être observé lorsque, au lieu de mesurer le taux d'anticorps anti-HA par la technique IHA, on a mesuré les IgG sériques par la technique ELISA ou la quantité de cellules sécrétrices d'IgG et la quantité de cellules sécrétrices d'IgA dans les poumons des souris immunisées (par la technique ELISPOT), ou le rapport entre les quantités d'IgG (respectivement IgA) spécifiques et les quantités d'IgG (respectivement IgA) totales dans les lavages naso-pharyngés des souris immunisées.

- 20 Des résultats similaires à ceux décrits aux exemples 11 à 16 ont été obtenus en remplaçant la DOPC par de la DOPE, ainsi qu'en faisant varier le rapport DC chol/lipide neutre, en maintenant la proportion molaire de lipide neutre associé au DC chol d'au moins 20 %.

5

Revendications

1. Utilisation d'un composé amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique pour la fabrication d'une composition vaccinale.
- 10 2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le groupement lipophile est un dérivé de cholestérol.
- 15 3. Utilisation selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le groupement cationique est un ammonium quaternaire ou une amine protonable.
4. Utilisation selon une des revendications précédentes caractérisée en ce que le groupement lipophile est relié au groupement cationique par une liaison ester, éther, amide ou carbamoyle.
- 20 5. Utilisation selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le groupement lipophile est séparé du groupement cationique par une chaîne alkylique ramifiée ou non comprenant de 1 à 20 atomes de Carbone.
- 25 6. Utilisation selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le composé amphipathique est choisi parmi les composés suivants :
- l'iodure de cholestéryl-3 β -carboxamidoéthylènetriméthylammonium,
 - la cholestéryl-3 β -carboxyamidoéthylèneamine,

30 - l'iodure de cholestéryl-3 β -oxysuccinamidoéthylènetriméthylammonium,

 - le 3 β -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyle]-cholestérol,
 - le 3 β -[N-(polyéthylèneamine)-carbamoyle]-cholestérol.
- 35 7. Utilisation de 3 β -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyle]-cholestérol pour la fabrication d'une composition vaccinale.
8. Utilisation selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le composé amphipathique est associé à un lipide neutre.
- 40 9. Utilisation selon la revendication 8 caractérisée, en ce que la proportion de lipide neutre associé est d'au moins 20 %.

- 5 10. Utilisation selon une des revendications 8 et 9, caractérisée en ce que le lipide neutre est la dioleoyl phosphatidyléthanoline (DOPE) ou la dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC).
- 10 11. Utilisation selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le composé amphipathique est dispersé dans un environnement aqueux sous forme de liposomes.
- 15 12. Utilisation comme adjuvant dans l'administration d'un vaccin d'un composé amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique.
- 20 13. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que ledit composé amphipathique est le 3β -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]cholestérol.
- 25 14. Utilisation selon une des revendications 12 ou 13, caractérisée en ce que ledit composé amphipathique est associé à un lipide neutre.
- 30 15. Composition vaccinale comprenant au moins un antigène, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un composé amphipathique possédant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique.
- 35 16. Composition vaccinale selon la revendication 15, caractérisée en ce que ledit groupement lipophile est un dérivé de cholestérol.
- 40 17. Composition vaccinale selon une des revendications 15 ou 16 caractérisée en ce que ledit composé amphipathique est le 3β -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]cholestérol.
18. Composition vaccinale selon une des revendications 15 à 17, caractérisée en ce que ledit composé amphipathique se présente sous forme de liposomes incluant au moins un antigène.
19. Composition vaccinale selon une des revendications 15 à 18, caractérisée en ce que ledit composé amphipathique est associé à un lipide neutre.
20. Composition vaccinale selon une des revendications 15 à 19, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un antigène du virus de la grippe.

- 5 21. Méthode d'induction d'une réponse immunitaire chez un mammifère, consistant à administrer au mammifère au moins un antigène, caractérisée en ce qu'elle consiste à administrer en outre au moins un composé amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement polaire.
- 10 22. Méthode selon la revendication 21 caractérisée en ce que ledit composé amphipathique est administré en même temps que l'antigène.
23. Méthode selon une des revendications 21 ou 22, caractérisée en ce que l'antigène est une hémagglutinine du virus de la grippe.
- 15 24. Produit contenant au moins un antigène et un composé amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique, comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans temps en vaccination.

1/12

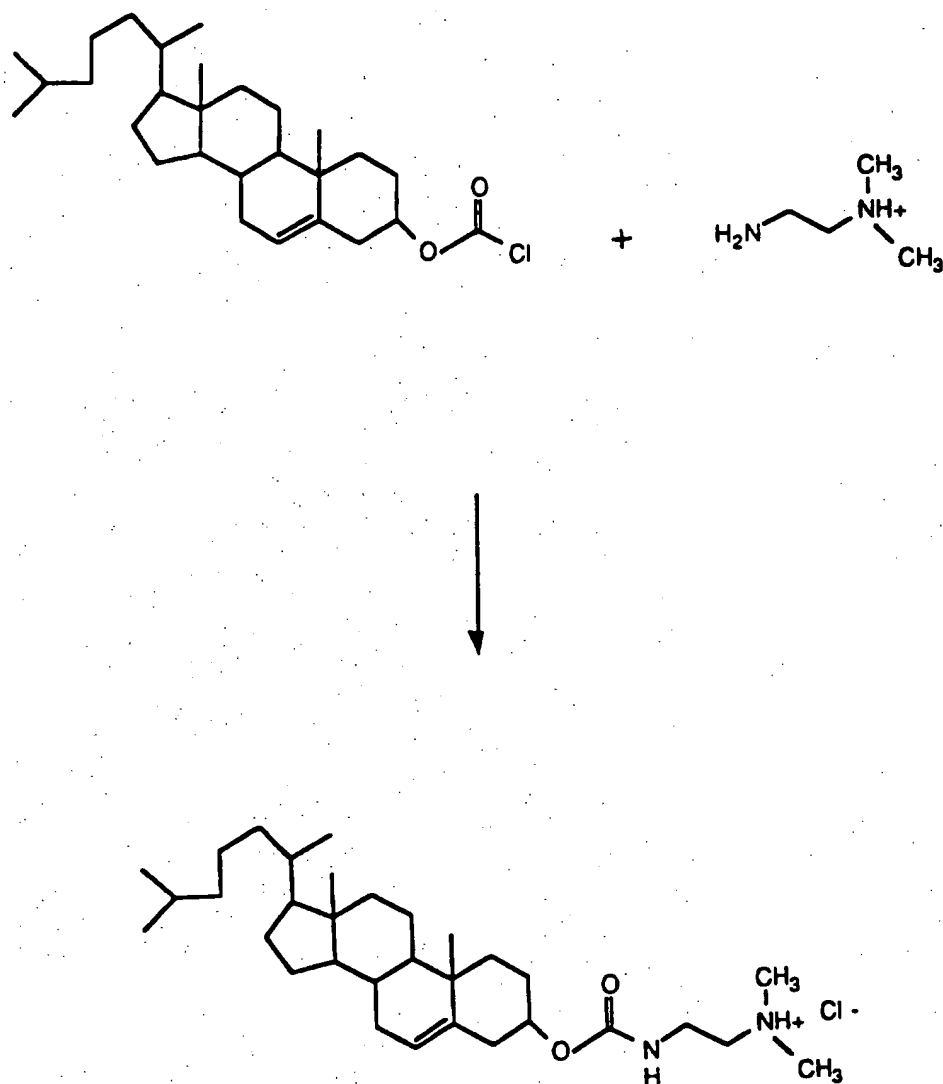


FIGURE 1

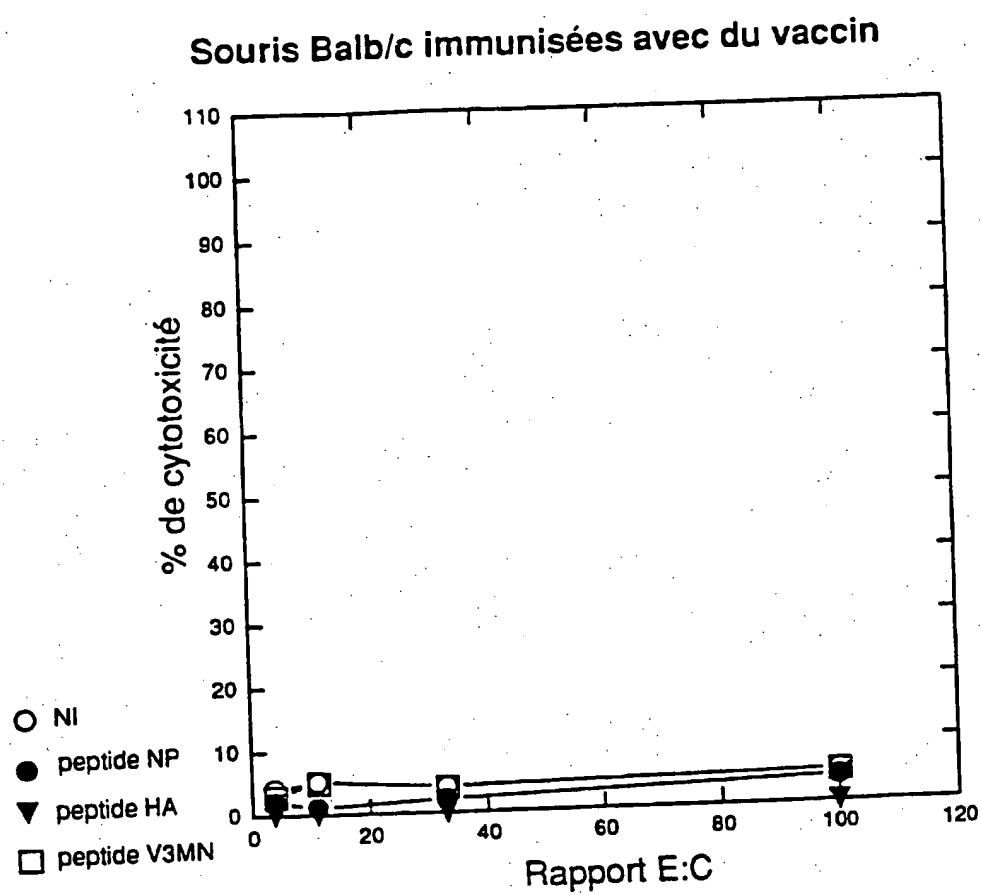


FIGURE 2

3/12

Souris Balb/c immunisées avec DC-CHOL 2,3mg

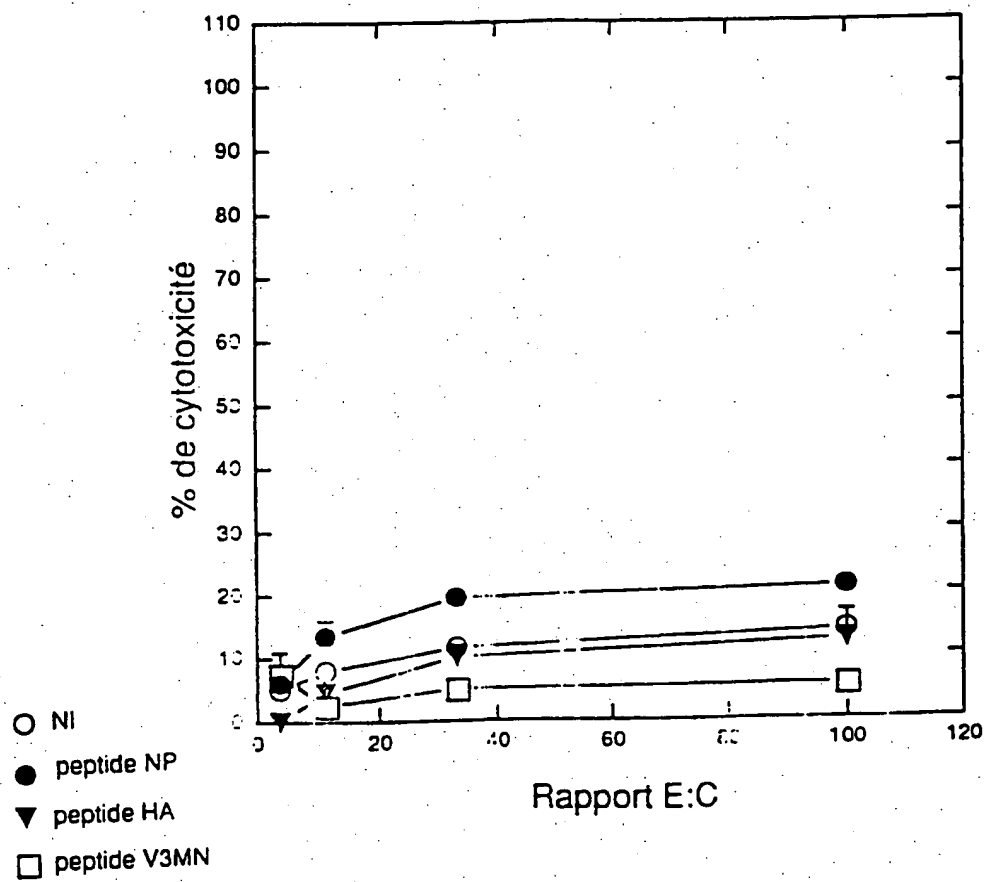


FIGURE 3

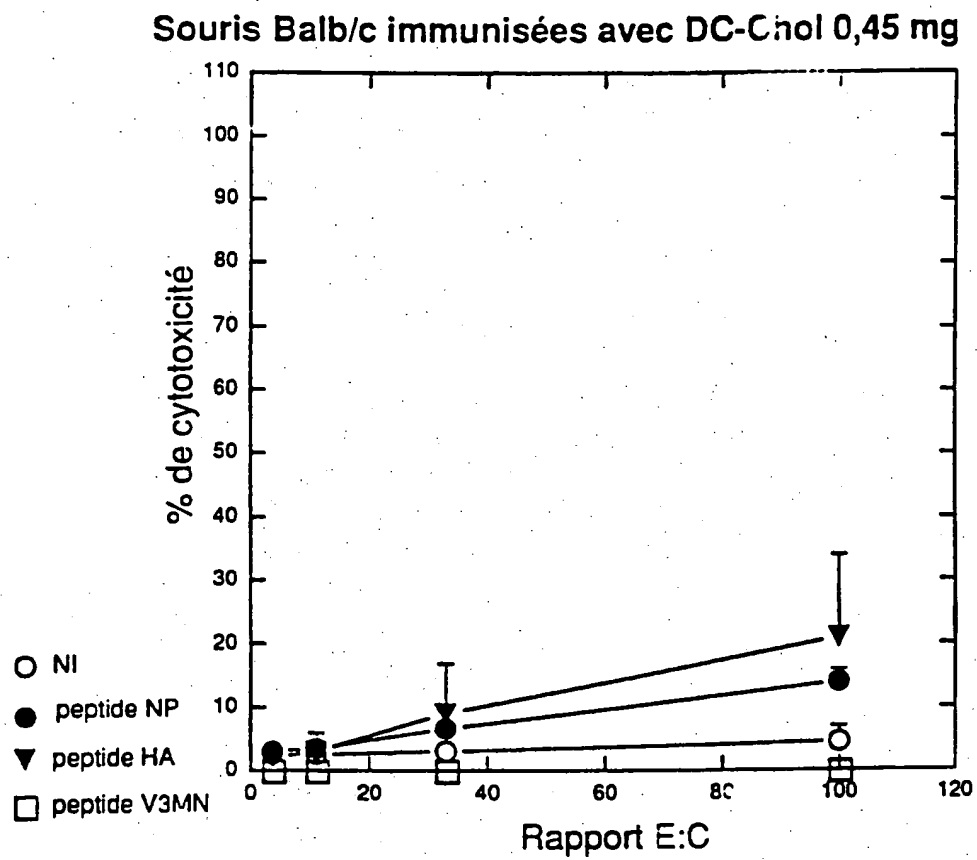


FIGURE 4

Souris Balb/c immunisées avec des Liposomes- DC CHOL DOPE

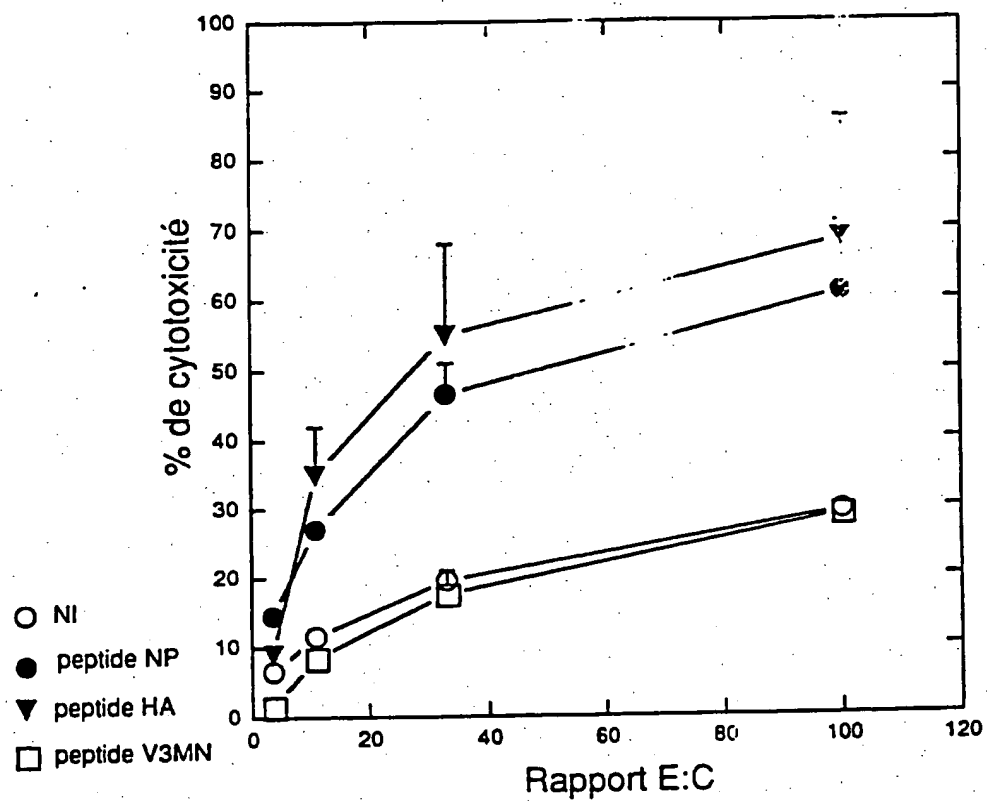


FIGURE 5

6/12

Souris Balb/c immunisées avec des Liposomes DC CHOL- DOPC

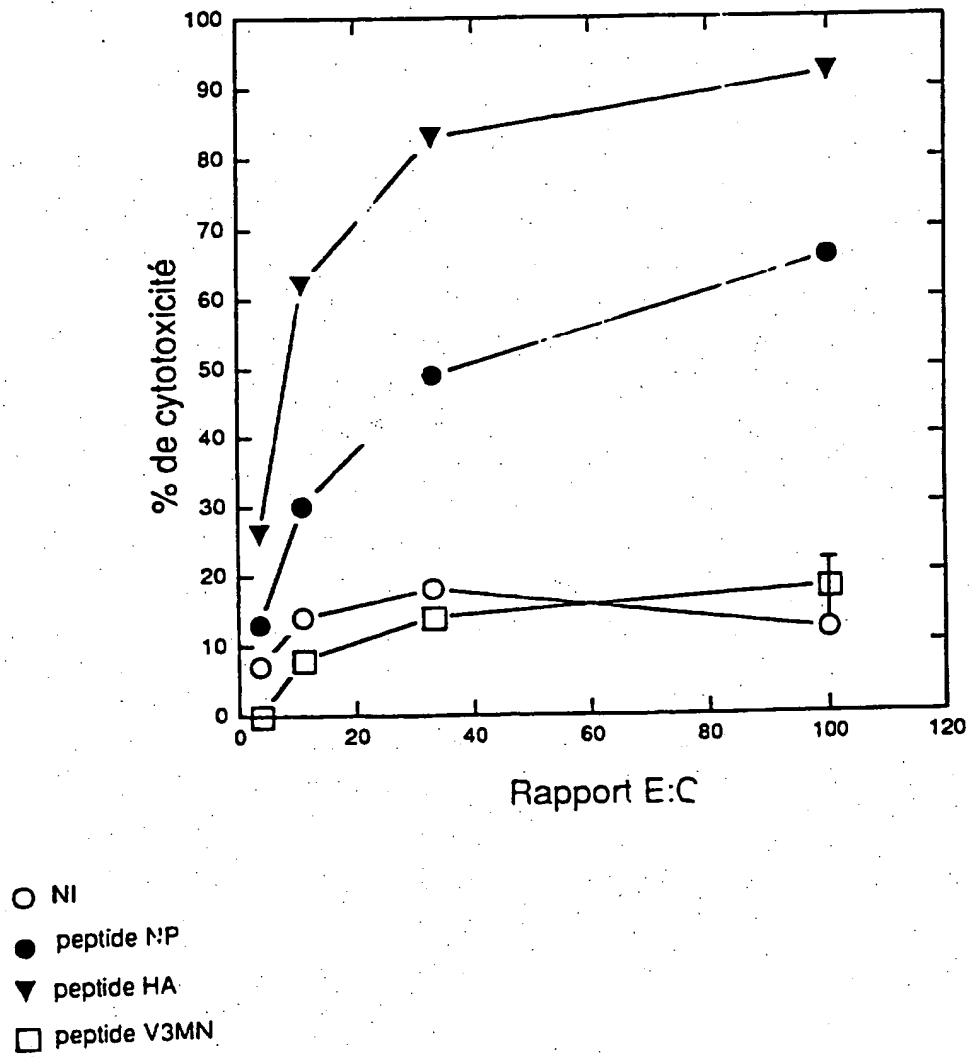
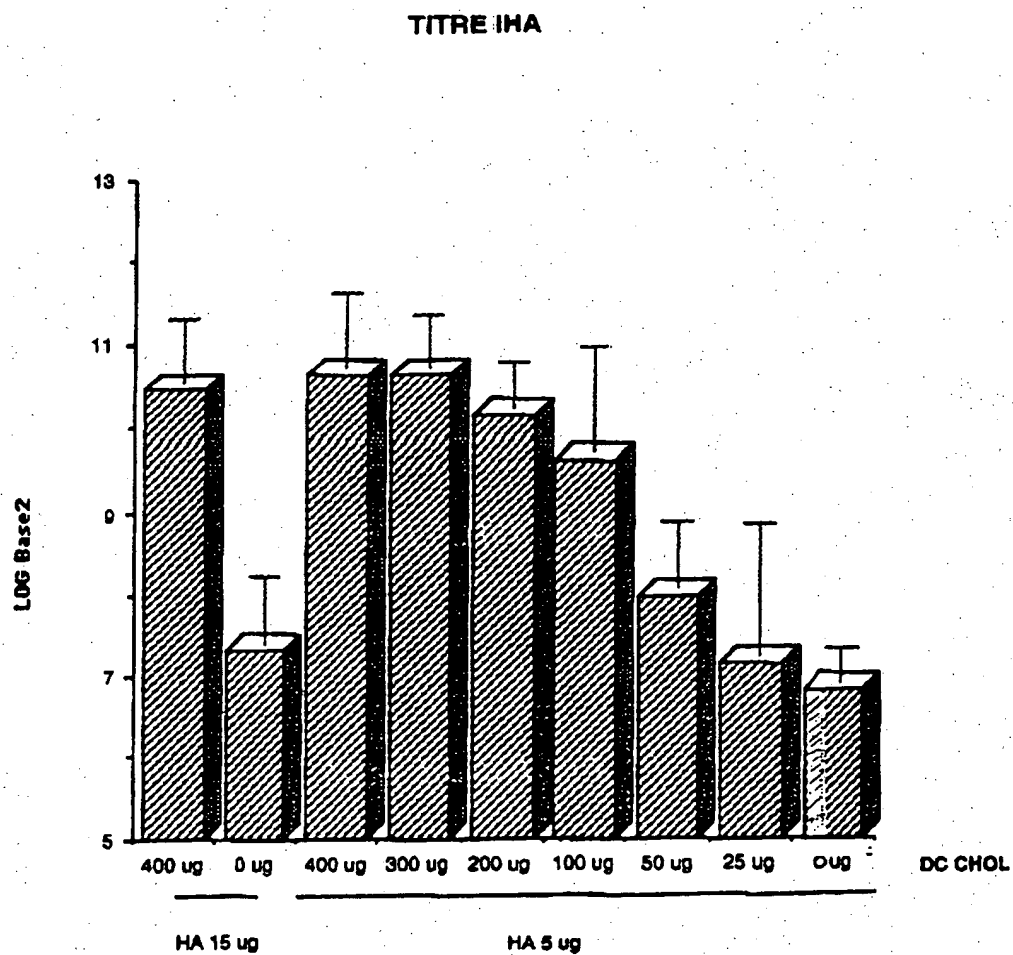


FIGURE 6

7/12

**FIGURE 7**

8/12

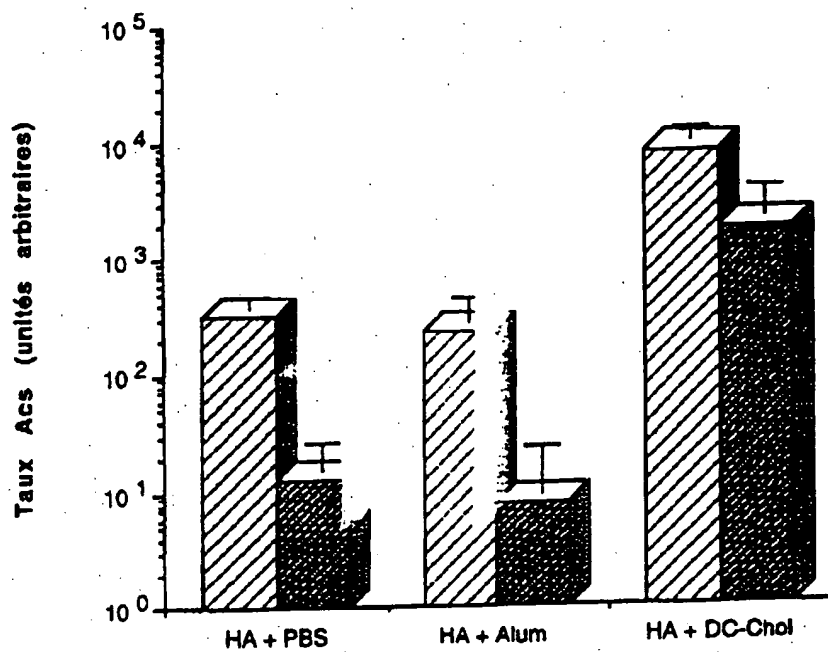


FIGURE 8

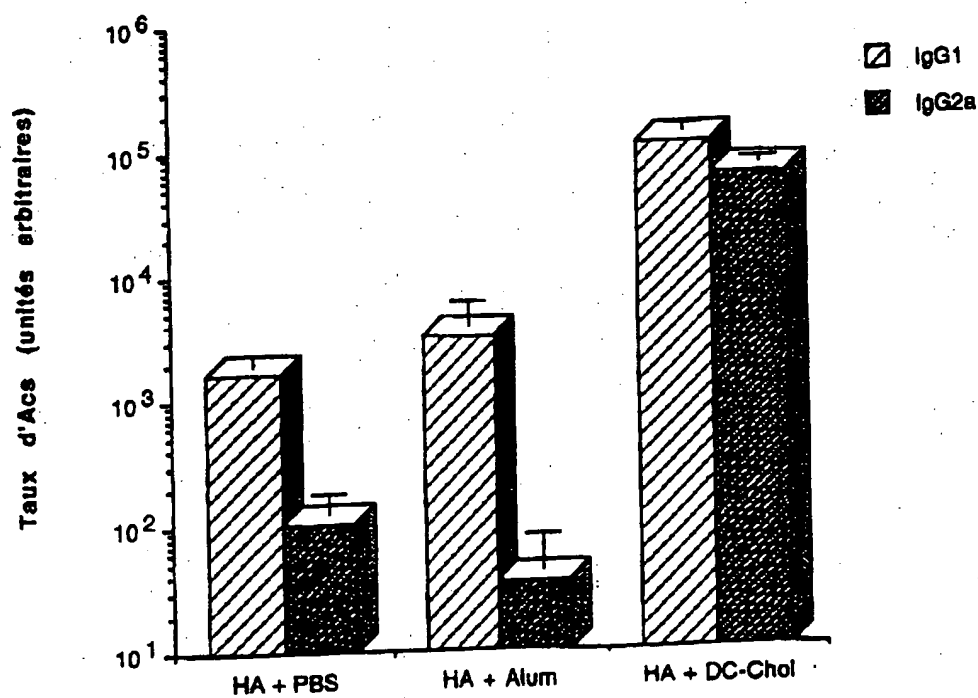


FIGURE 9

9/12

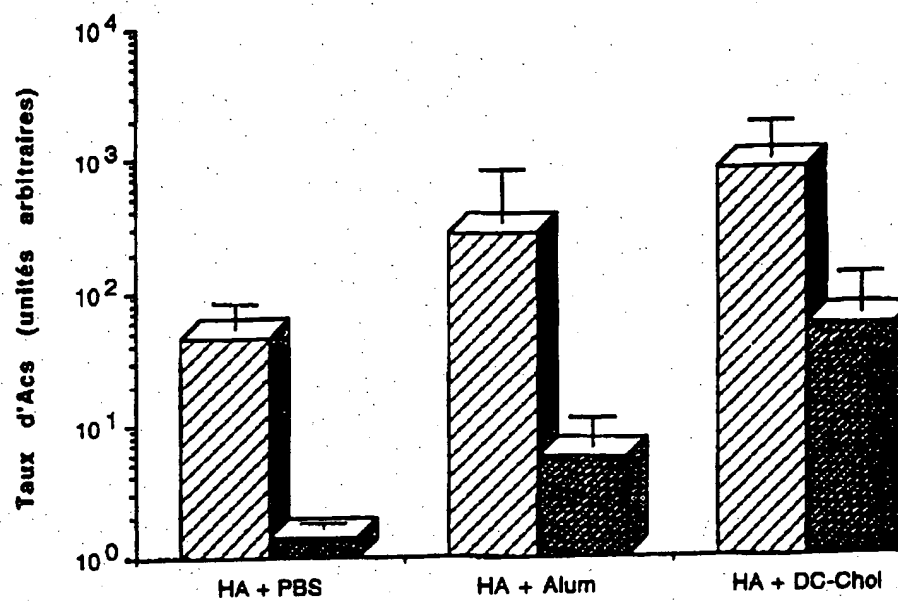


FIGURE 10

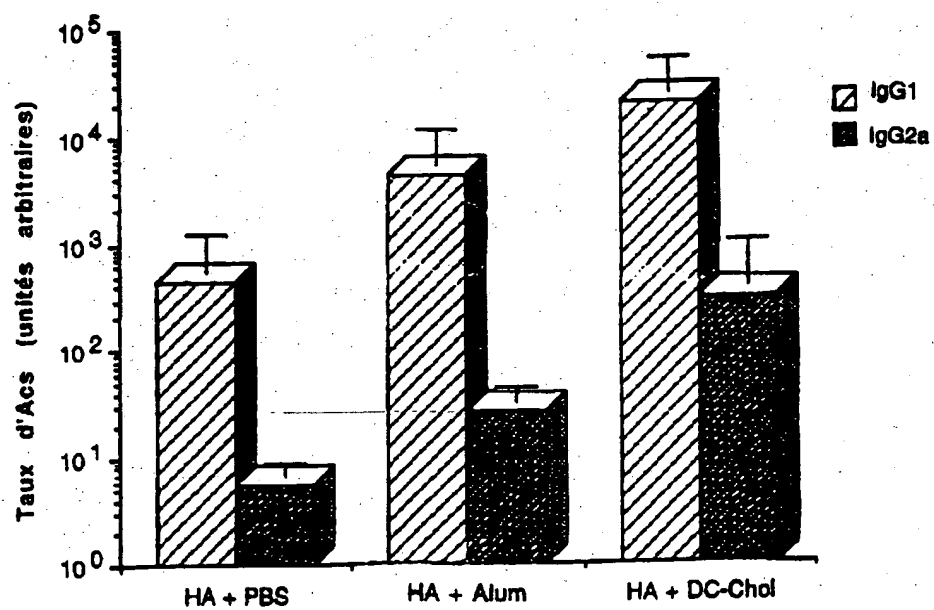


FIGURE 11

10/12

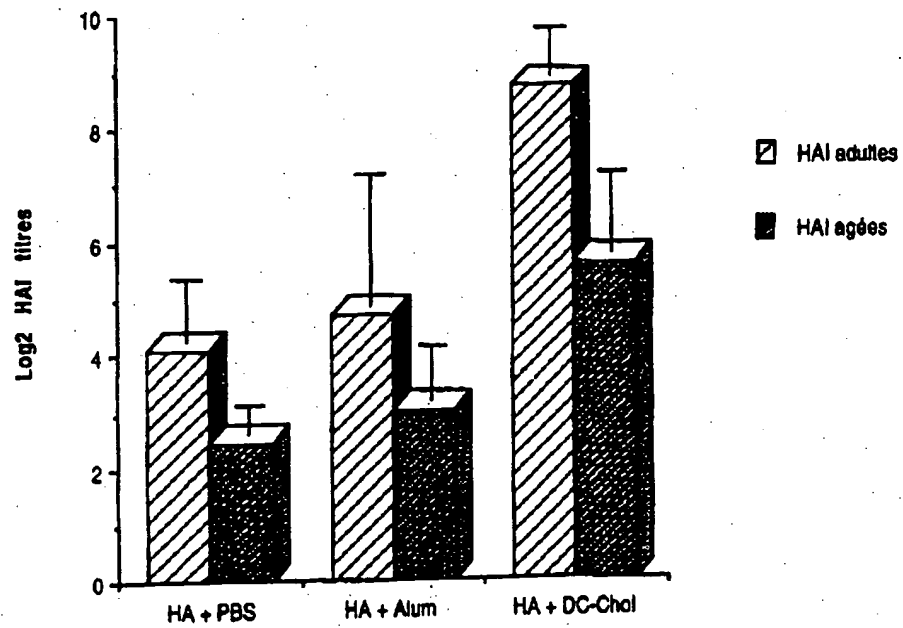


FIGURE 12

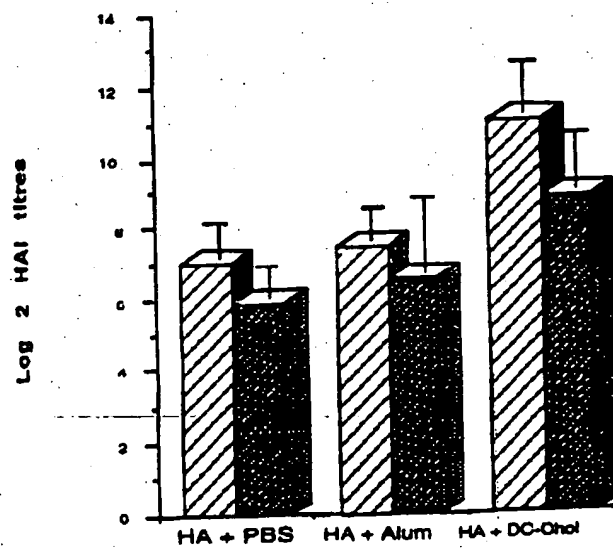


FIGURE 13

11/12

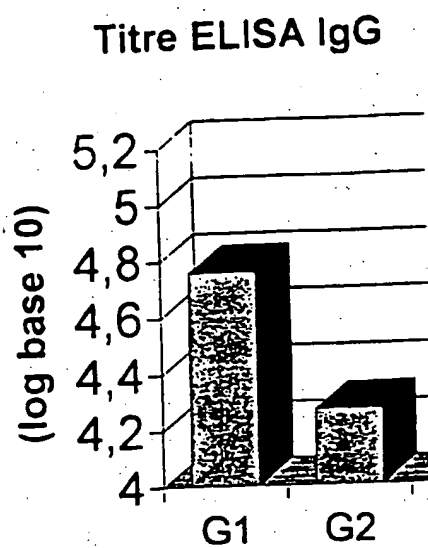


FIGURE 14

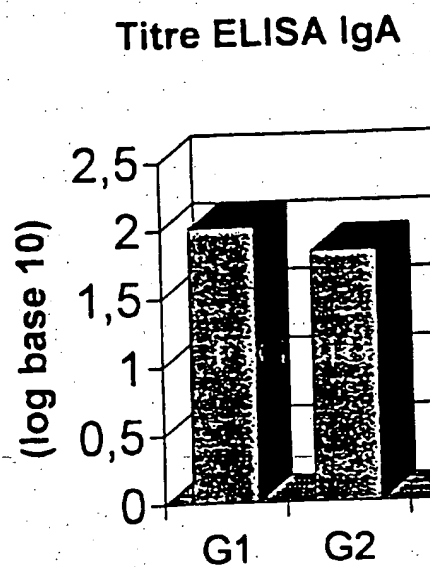


FIGURE 15

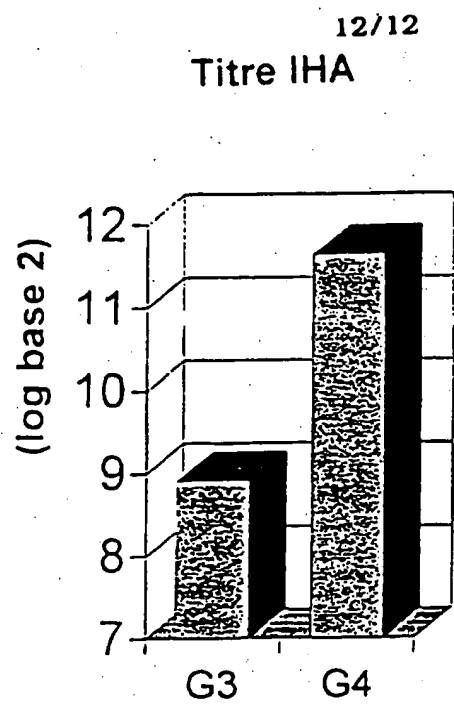


FIGURE 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/01495

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K9/127 A61K47/28 A61K39/39

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,93 05162 (THE UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH CORPORATION) 18 March 1993 see the whole document & US,A,5 283 185 cited in the application	1-24
Y	EP,A,0 356 339 (THE LIPOSOME COMPANY, INC.) 28 February 1990 see page 6, line 63 - page 11, line 56 --- -/--	1-24

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 February 1996

Date of mailing of the international search report

23.02.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Benz, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/FR 95/01495

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH, vol. 4, no. 3, November 1994 MONZICELLO (US), pages 1075-1090, XP 000476607 K.M. HUI ET AL. 'induction of alloreactive cytotoxic T lymphocytes by intra-splenic immunization with allogeneic class I Major Histocompatibility complex DNA and Dc-chol cationic liposomes' see the whole document ---	1-24
Y	WO,A,93 14744 (CHIRON CORPORATION) 5 August 1993 see the whole document ---	1-24
A	US,A,4 971 803 (LI ET AL.) 20 November 1990 see the whole document see column 6; examples III-VI ---	1-4
A	US,A,4 261 975 (FULLERTON ET AL.) 14 April 1981 see the whole document -----	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR95/01495

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although Claims 21-23 are directed to a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/01495

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9305162	18-03-93	US-A- 5283185	01-02-94
		AU-B- 665029	14-12-95
		AU-B- 2656592	05-04-93
		CA-A- 2116676	18-03-93
		EP-A- 0663013	19-07-95
		JP-T- 7500963	02-02-95

EP-A-0356339	28-02-90	AT-T- 119037	15-03-95
		AT-T- 113472	15-11-94
		AU-B- 631377	26-11-92
		CA-A- 1334165	31-01-95
		CA-A- 1337332	17-10-95
		DE-D- 68919173	08-12-94
		DE-T- 68919173	09-03-95
		DE-D- 68921389	06-04-95
		DE-T- 68921389	29-06-95
		EP-A- 0356340	28-02-90
		EP-A- 0626169	30-11-94
		ES-T- 2069600	16-05-95
		ES-T- 2063154	01-01-95
		JP-T- 4500203	16-01-92
		WO-A- 9001947	08-03-90
		WO-A- 9001948	08-03-90
		US-A- 5100662	31-03-92

WO-A-9314744	05-08-93	AU-B- 3614493	01-09-93

US-A-4971803	20-11-90	NONE	

US-A-4261975	14-04-81	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

ande Internationale No
PCT/FR 95/01495

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K9/127 A61K47/28 A61K39/39

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO,A,93 05162 (THE UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH CORPORATION) 18 Mars 1993 voir le document en entier & US,A,5 283 185 cité dans la demande ---	1-24
Y	EP,A,0 356 339 (THE LIPOSOME COMPANY, INC.) 28 Février 1990 voir page 6, ligne 63 - page 11, ligne 56 --- -/--	1-24

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- * "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- * "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- * "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- * "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- * "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

* "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

* "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

* "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

* "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 Février 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23.02.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Benz, K

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

ande Internationale No
PCT/FR 95/01495

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH, vol. 4, no. 3, Novembre 1994 MONZICELLO (US), pages 1075-1090, XP 000476607 K.M. HUI ET AL. 'induction of alloreactive cytotoxic T lymphocytes by intra-splenic immunization with allogeneic class I Major Histocompatibility complex DNA and Dc-cho1 cationic liposomes' voir le document en entier ---	1-24
Y	WO,A,93 14744 (CHIRON CORPORATION) 5 Août 1993 voir le document en entier ---	1-24
A	US,A,4 971 803 (LI ET AL.) 20 Novembre 1990 voir le document en entier voir colonne 6; exemples III-VI ---	1-4
A	US,A,4 261 975 (FULLERTON ET AL.) 14 Avril 1981 voir le document en entier -----	1-24

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

emande internationale n°

PCT/FR95/01495

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n°^{es} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
Remarque: Bien que les revendications 21-23 concernant une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés à la composition.
2. ☐ Les revendications n°^{es} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°^{es} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°^{es}:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°^{es}:

Remarque quant à la réserve *

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

ande Internationale No
PCT/FR 95/01495

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9305162	18-03-93	US-A- 5283185	01-02-94
		AU-B- 665029	14-12-95
		AU-B- 2656592	05-04-93
		CA-A- 2116676	18-03-93
		EP-A- 0663013	19-07-95
		JP-T- 7500963	02-02-95

EP-A-0356339	28-02-90	AT-T- 119037	15-03-95
		AT-T- 113472	15-11-94
		AU-B- 631377	26-11-92
		CA-A- 1334165	31-01-95
		CA-A- 1337332	17-10-95
		DE-D- 68919173	08-12-94
		DE-T- 68919173	09-03-95
		DE-D- 68921389	06-04-95
		DE-T- 68921389	29-06-95
		EP-A- 0356340	28-02-90
		EP-A- 0626169	30-11-94
		ES-T- 2069600	16-05-95
		ES-T- 2063154	01-01-95
		JP-T- 4500203	16-01-92
		WO-A- 9001947	08-03-90
		WO-A- 9001948	08-03-90
		US-A- 5100662	31-03-92

WO-A-9314744	05-08-93	AU-B- 3614493	01-09-93

US-A-4971803	20-11-90	AUCUN	

US-A-4261975	14-04-81	AUCUN	
